

22.10.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 11 NOV 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年    9 月 2 2 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 3 3 0 2 5 8  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 3 3 0 2 5 8 ]

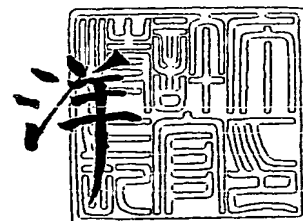
出      願      人                      学 校 法 人    久 留 米 大 学  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 0 月 1 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 PQU-11363  
【提出日】 平成15年 9月22日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G01N 33/53  
G01N 33/68

【発明者】  
【住所又は居所】 佐賀県三養基郡基山町けやき台 2 - 2 5 - 9  
【氏名】 伊東 恭悟

【発明者】  
【住所又は居所】 福岡県小郡市三国ヶ丘 2 - 1 1 3  
【氏名】 山田 亮

【発明者】  
【住所又は居所】 福岡県福岡市早良区西新 5 - 1 4 - 1 8  
【氏名】 佐田 通夫

【特許出願人】  
【識別番号】 599045903  
【氏名又は名称】 学校法人 久留米大学

【代理人】  
【識別番号】 100065248  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 野河 信太郎  
【電話番号】 06-6365-0718

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 014203  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

H L A結合モチーフを配列中に含み、かつ、C型肝炎ウイルスに反応する抗体により認識されることを特徴とするC型肝炎ウイルス由来ペプチド。

**【請求項 2】**

前記ペプチドが配列番号1～7のいずれか1つで表されるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1に記載のC型肝炎ウイルス由来ペプチド。

**【請求項 3】**

配列番号1～7のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性をもつアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1または2に記載のC型肝炎ウイルス由来ペプチド。

**【請求項 4】**

H L A-A 2またはH L A-A 2 4拘束性細胞傷害性T細胞による認識性をさらに有することを特徴とする請求項1～3のいずれか1つに記載のC型肝炎ウイルス由来ペプチド。

**【請求項 5】**

請求項1～4のいずれか1つに記載のC型肝炎ウイルス由来ペプチドを含むことを特徴とするポリペプチド。

**【請求項 6】**

請求項5に記載のポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性をもつアミノ酸配列を有することを特徴とするポリペプチド。

**【請求項 7】**

H L A-A 2またはH L A-A 2 4拘束性細胞傷害性T細胞による認識性をさらに有することを特徴とする請求項5または6に記載のポリペプチド。

**【請求項 8】**

請求項1～4のいずれか1つに記載のC型肝炎ウイルス由来ペプチド、または請求項5～7のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードすること、またはこれらに対して相補的な配列を有することを特徴とするヌクレオチド。

**【請求項 9】**

請求項1～4のいずれか1つに記載のC型肝炎ウイルス由来ペプチド、または請求項5～7のいずれか1つに記載のポリペプチドを認識することを特徴とする抗体または抗体類似活性物質。

**【請求項 10】**

請求項8に記載のヌクレオチドを含有することを特徴とするベクター。

**【請求項 11】**

請求項1～4のいずれか1つに記載のC型肝炎ウイルス由来ペプチド、または請求項5～7のいずれか1つに記載のポリペプチドを用いて細胞傷害性T細胞を誘導することを特徴とする細胞傷害性T細胞の誘導方法。

**【請求項 12】**

請求項1～4のいずれか1つに記載のC型肝炎ウイルス由来ペプチド、請求項5～7のいずれか1つに記載のポリペプチド、請求項8に記載のヌクレオチド、または請求項9に記載の抗体もしくは抗体類似活性物質を使用することを特徴とするC型肝炎ウイルスの検出方法。

**【請求項 13】**

請求項1～4のいずれか1つに記載のC型肝炎ウイルス由来ペプチド、請求項5～7のいずれか1つに記載のポリペプチド、請求項8に記載のヌクレオチド、あるいは請求項9に記載の抗体または抗体類似活性物質を使用することを特徴とするC型肝炎ウイルス感染症の診断方法。

**【請求項 14】**

請求項1～4のいずれか1つに記載のC型肝炎ウイルス由来ペプチド、請求項5～7の

いずれか 1 つに記載のポリペプチド、請求項 8 に記載のヌクレオチド、あるいは請求項 9 に記載の抗体または抗体類似活性物質を使用することを特徴とする C 型肝炎ウイルス感染症の予防または治療方法。

【請求項 15】

請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 つに記載の C 型肝炎ウイルス由来ペプチド、請求項 5 ～ 7 のいずれか 1 つに記載のポリペプチド、請求項 8 に記載のヌクレオチド、あるいは請求項 9 に記載の抗体または抗体類似活性物質を有効成分として含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 16】

医薬組成物が C 型肝炎ウイルスワクチンであることを特徴とする請求項 16 に記載の医薬組成物。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】C型肝炎ウイルス由来ペプチド

## 【技術分野】

## 【0001】

この発明は、C型肝炎ウイルスの診断およびC型肝炎の治療に有用な、C型肝炎ウイルス(HCV)ペプチドに関するものである。

さらに詳細には、この発明は、HCVペプチド、HCVペプチドを含むポリペプチド、HCVペプチドもしくは前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド、またはそれらを認識する抗体もしくは抗体類似活性物質、前記ヌクレオチドを含有するベクター、HCVペプチドもしくは前記ポリペプチドを用いて細胞傷害性T細胞を誘導する誘導方法、あるいはHCVペプチド、前記ポリペプチド、前記ヌクレオチドもしくは前記抗体・抗体類似活性物質を使用したC型肝炎ウイルスの検出方法、C型肝炎の診断、予防もしくは治療方法、ならびにそれらを含むC型肝炎治療用医薬組成物に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

ウイルス性肝炎には、主としてウイルスが経口感染するA型肝炎と血液を介して感染するB型肝炎の他に、主に輸血などで感染するC型肝炎などがある。そのC型肝炎は、慢性化して肝硬変や肝臓癌に移行する割合が非常に高い疾患の1つである。

## 【0003】

C型肝炎ウイルス(HCV)は、フラビウイルス科に属する1本鎖RNAウイルスであり、日本に200万人以上、世界中では1億7000万人もC型肝炎ウイルス感染者はいると言われている。

このC型肝炎に対しては、インターフェロンとリバビリン併用療法が行なわれているが、2～3割の患者に対してのみ有効であり、大半の患者に対しては現在有効な治療法がないのが実状である。したがって、安全で有効かつ簡単な上に、低コストの診断ならびに治療ツールを緊急に開発することへの強い社会的要請がある。

## 【0004】

細胞性ならびに液性免疫応答の両者はHCV感染を抑制するのに主要な役割を果たしていることを示す証拠がある(特許文献1)。過去10余年にわたって高い免疫原性のHCVペプチドを見い出す研究が数多くなされ、細胞性または液性免疫応答を誘導することができる数多くのHCVペプチドが見出されてきた(非特許文献1)。しかしながら、これらのペプチドのいずれも臨床的に有効ではなく、その結果、現在でも予防的にも治療的にも有効な免疫治療の手段がないのが実状である。このことは、主にこれらのペプチドの免疫原性が弱いことに基づいていると考えられる。

## 【0005】

また、本発明者らは、いくつかのCTL誘発ペプチドが、インビトロでもインビボでも細胞性免疫応答および液性免疫応答の両方を導き出す能力を有していることをすでに報告している(非特許文献2～5)。

さらに、細胞性ならびに液性免疫応答の両者によって認識されるHCVペプチドは、細胞性免疫応答だけによって認識されるものよりも免疫原性が高いと考えられる。

## 【0006】

【特許文献1】特表平2-500880号公報

【非特許文献1】Hunziker IP, Zurbriggen R, Glueck R, Engler OB, Reichen J, Dai WJ, Pichler WJ, Cerny A., Perspectives: Towards a peptide-based vaccine against hepatitis C virus. Mol Immunol. 2001 Dec; 38(6): 475-84.

【非特許文献2】Gohara R, Imai N, Rikimaru T, Yamada A, Hida N, Ichiki M, Kawamoto M, Matsunaga K, Ashihara J, Yano S, Tamura M, Ohkouchi S, Yamana H, Oizumi K, Itoh K., Phase 1 clinical study of cyclophilin B peptide vaccine for patients with lung cancer, J Immunother. 2002 Sep-Oct; 25(5): 439-44.

【非特許文献3】Miyagi Y, Imai NSasatomi T, Yamada A, Mine T, Katagiri K, Na

kagawa M, Muto A, Okouchi S, Isomoto H, Shirouzu K, Yamana H, Itoh K., Induction of cellular immune responses to tumor cells and peptides in colorectal cancer patients by vaccination with SART3 peptides. Clin Cancer Res. 2001 Dec; 7(12): 3950-62.

【非特許文献4】Tanaka S, Harada M, Mine T, Noguchi M, Gohara R, Azuma K, Tamura M, Yamada A, Morinaga A, Nishikori M, Katagiri K, Itoh K, Yamana H, Hashimoto T., Peptide vaccination for patients with melanoma and other types of cancer based on pre-existing peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte precursors in the periphery, J Immunother. 2003 Jul-Aug; 26(4): 357-66.

【非特許文献5】Mine T, Gohara R, Hida N, Imai N, Azuma K, Rikimaru T, Katagiri K, Nishikori M, Sukehiro A, Nakagawa M, Yamada A, Aizawa H, Shirouzu K, Itoh K, Yamana H., Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients, Cancer Sci. 2003 Jun; 94(6): 548-56.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

かかる社会的要請に応えるための1つの新しいアプローチとして、細胞性免疫応答ならびに液性免疫応答の両者を誘導することができるHCVペプチドが、液性免疫応答だけを有するペプチドに比べて、より一層高い免疫原性を有しているとの一連の知見が蓄積されてきているので、かかるペプチドを特定するというアプローチを挙げることができる。

そこで、かかるペプチドを同定するとともに、HCV感染を抑制するための新規な治療および診断ツールとしての候補となるかどうかを調べることは、有益であると考えられる。

【0008】

したがって、本発明者らは、HLA-A2およびHLA-A24拘束性細胞傷害性Tリンパ球(CTL)によって認識されるペプチドと反応性を有するIgGがHCV感染患者の血清中から検出できるかどうかを調べた結果、核(コア)タンパク質由来の1つのCTLエピトープに特異的なIgGが、異なるHLAクラスIタイプや異なるHCVゲノタイプには関係なく、HCV感染患者の大多数に検出されることを見出した。さらに、この結果から、かかるペプチドが、ペプチドをベースとする予防および治療用の新しいツールを提供することができることを見出して、この発明を完成するに至った。

【0009】

したがって、この発明は、細胞性免疫応答ならびに液性免疫応答によって認識され、かつ免疫原性が高いことを特徴とするHCVペプチドを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記課題を解決するために、この発明は、HLA結合モチーフを配列中に含み、かつC型肝炎ウイルス感染患者の血中抗体により認識されるC型肝炎ウイルス由来ペプチドを提供する。

この発明は、その好ましい態様として、配列表の配列番号1~7のいずれか1つで表されるアミノ酸配列を有するC型肝炎ウイルス由来ペプチド、該ペプチドのアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性をもつアミノ酸配列を有するC型肝炎ウイルス由来ペプチド、およびHLA-A2またはHLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞による認識性をさらに有するC型肝炎ウイルス由来ペプチドを提供する。

【0011】

この発明の別の形態は、該C型肝炎ウイルス由来ペプチドを含むポリペプチドを提供する。この形態の発明は、その好ましい態様として、該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性をもつアミノ酸配列を有するポリペプチド、およびHLA-A2またはHLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞による認識性をさらに有するポリペプチドを提供する。

**【0012】**

また、この発明の別の形態は、該C型肝炎ウイルス由来ペプチドまたは該ポリペプチドをコードするヌクレオチドを提供する。

**【0013】**

この発明のさらに別の形態は、該C型肝炎ウイルス由来ペプチドまたは該ポリペプチドを免疫学的に認識することができる抗体および抗体類似活性物質を提供する。

この発明は、さらに別の形態として、上記のヌクレオチドを含有するベクターを提供する。

**【0014】**

また、この発明のさらに別の形態は、該C型肝炎ウイルス由来ペプチド、該ポリペプチドをコードする該ヌクレオチドを用いて細胞傷害性T細胞を誘導する誘導方法を提供する。

**【0015】**

この発明は、さらに別の形態として、上記のC型肝炎ウイルス由来ペプチド、ポリペプチド、ヌクレオチド、または抗体もしくは抗体類似活性物質を使用する、C型肝炎ウイルスの検出方法を提供する。

**【0016】**

また、この発明の別の形態は、上記のC型肝炎ウイルス由来ペプチド、ポリペプチド、ヌクレオチド、または抗体もしくは抗体類似活性物質を使用する、C型肝炎などのHCV感染関連疾患の診断方法を提供する。

さらに、別の形態として、この発明は、上記のC型肝炎ウイルス由来ペプチド、ポリペプチド、ヌクレオチド、または抗体もしくは抗体類似活性物質を使用する、C型肝炎などのHCV感染関連疾患の治療方法を提供する。

**【0017】**

この発明は、さらに別の形態として、上記のC型肝炎ウイルス由来ペプチド、ポリペプチド、ヌクレオチド、または抗体もしくは抗体類似活性物質を有効成分として含む医薬組成物を提供する。また、その好ましい態様として、該医薬組成物がC型肝炎ウイルスワクチンである医薬組成物が提供される。

**【発明を実施するための最良の形態】****【0018】**

この発明に係るC型肝炎ウイルス由来ペプチドは、HLA結合モチーフを配列中に含み、かつC型肝炎ウイルス感染患者の血中抗体により認識されるHCVペプチドである。

また、この発明に係るHCVペプチドは、HLA結合モチーフ、つまりHLA-A2またはHLA-A24結合モチーフをその配列中に含んでいる。さらに、このHCVペプチドは、細胞性免疫応答および液性免疫応答によって認識されるとともに、免疫原性が高いことを特徴としている。

**【0019】**

かかるHCVペプチドとしては、例えば、配列表の配列番号1などで表されるアミノ酸配列を有するHLA-A2結合性モチーフを有するペプチド、または配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、もしくは配列番号7で表されるアミノ酸配列を有するHLA-A24結合性モチーフを有するペプチドを挙げることができる。

特に、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド反応性IgG抗体のHCV感染患者からの検出率およびHCV感染症特異性は、それぞれ93%と100%であった。

**【0020】**

この発明に係るHCVペプチドは、該ペプチドのアミノ酸配列と少なくとも70%、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有するペプチドであってもよい。

**【0021】**

また、この発明に係るHCVペプチドは、HLA-A2またはHLA-A24拘束性細

胞傷害性T細胞（CTL）による認識性を有するペプチドをさらに含んでいてもよい。細胞内で製造された抗原ペプチドが細胞内で分解されたペプチドからなる、このHLAに結合可能な抗原ペプチドには、HLAのタイプごとにその配列にモチーフがあり、細胞傷害性T細胞（CTL）はこの抗原ペプチドとHLAとの複合体を認識してHCV細胞を傷害する。

#### 【0022】

この発明に係るポリペプチドは、上記のようなこの発明のペプチドのアミノ酸配列をそのアミノ酸配列中に含有しており、そのアミノ酸の総数は特に限定されるものではない。また、この発明のポリペプチドにおいて、このペプチドを構成するアミノ酸を超える残りのアミノ酸は、該ペプチドのアミノ酸のN-末端側および/またはC-末端側に、あるいはそれらの両側に位置している。したがって、このポリペプチドは、上記ペプチドの機能ならびに作用と実質的に同様の機能と作用を有している。なお、本明細書において、「ペプチド」と単に記載した場合でも、特に断りのない場合には、「ポリペプチド」をも包含して理解すべきものとする。

#### 【0023】

上記のようにして決定されたアミノ酸配列を有するペプチドは、通常の化学的合成法、タンパク分子の酵素的分解法、目的のアミノ酸配列をコードする塩基配列を発現するように形質転換した宿主を用いた遺伝子組換え技術などにより得ることができる。

#### 【0024】

目的とする該ペプチドを化学的合成法で製造する場合には、通常のペプチド化学においてそれ自体公知の慣用されている手法によって製造することができ、例えば、ペプチド合成機を使用して、固相合成法により合成することができる。このようにして得られた粗ペプチドは、タンパク質化学において通常使用されている精製方法、例えば、塩析法、限外ろ過法、逆相クロマトグラフィー法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法などによって精製することができる。

#### 【0025】

一方、所望の該ペプチドを遺伝子組換え技術で生産する場合には、例えば、上記により合成した目的のアミノ酸配列をコードするDNA断片を適当な発現ベクターに組み込み、この発現ベクターを用いて微生物や動物細胞を形質転換して、得られた形質転換体を培養することによって、所望の該ペプチドを得ることができる。使用できる発現ベクターとしては、当該技術分野において公知であるプラスミド、ウイルスベクターなどを用いることができる。

#### 【0026】

このペプチド生産技術における発現ベクターを用いた宿主細胞の形質転換方法としては、それ自体公知の方法、例えば、塩化カルシウム法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、リポフェクチン法、エレクトロポレーション法などが使用でき、使用する宿主細胞に基づいて適宜選択するのがよい。得られたペプチドの精製は、培養した培地から回収した細胞抽出液もしくは培養上清から上記精製法により行なうことができる。

#### 【0027】

この発明の別の形態の1つとしてのヌクレオチドは、上記のC型肝炎ウイルス由来ペプチドまたは上記のポリペプチドを含有するオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドを含んでいて、リボヌクレオチドあるいはデオキシヌクレオチドを含んでいる。また、該ヌクレオチドは、当該分野で既知の方法によって改変されていてもよい。該ヌクレオチドの改変には、例えば、公知の標識、メチル化、「caps」、アナログによる天然ヌクレオチド1つ以上の置換、ヌクレオチド内改変などが含まれる。ヌクレオチド内改変には、例えば、非イオン性改変（例えば、メチルリン酸、リン酸トリエステル、ホスホアミデートなど）、イオン性改変（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）、例えばタンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチドなど）のようなペンダント部分を含む改変、キレート剤（例えば、金属、ホウ素など）による改変などが挙げられる。



**【0028】**

上記のヌクレオチド配列は、HCVのゲノム中にコードされているHCV抗原のペプチドおよびポリペプチド配列を提供することを可能にし、また診断試験やワクチンの成分として、有用なペプチドを提供することができる。

**【0029】**

この発明のヌクレオチドが得られると、HCV感染関連疾患を診断するのに有用な、または血液中もしくは血液製剤中のHCV感染をスクリーニングするのに有用なヌクレオチドプローブならびにペプチドの構築が可能となる。このヌクレオチド配列から、例えば24個ないし30個のヌクレオチドあるいはそれより長いDNAオリゴマーを合成することが可能である。このヌクレオチドは、被験者の血清中のHCV RNAを検出するための、また血液もしくは血液製剤中のHCVの存在をスクリーニングするためのプローブとしても使用することができる。

また、このヌクレオチド配列は、HCVに対する抗体の存在を診断する試薬としても有用なHCV特異的ペプチドの設計ならびに生産を可能にする。さらに、この配列に由来する精製ペプチドに対する抗体は、HCV感染者ならびにHCV感染血液製剤中のHCV抗原を検出するためにも使用することができる。

**【0030】**

この発明の別の形態の1つとしての抗体は、該C型肝炎ウイルス由来ペプチド、該ポリペプチドに反応性を有するキメラ抗体、改変抗体、一価抗体、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、F(解読不能)、単鎖Fv(scFv)タンパク質ならびに単ドメイン抗体が含まれる。また、この抗体は、該ペプチドまたは該ポリペプチドを免疫学的に認識することができる。

**【0031】**

この発明の別の形態の1つとしてのベクターは、該ヌクレオチドを含有していて、選択された宿主細胞を形質転換し得る構築物であって、該宿主中で異種のコード配列を発現させることができる。この発現ベクターは、クローニングベクターあるいは組み込み用ベクターの何れであってもよい。

**【0032】**

クローニングベクターとしては、例えば、プラスミド、ウイルス(例えば、アデノウイルスベクター)などが使用される。また該クローニングベクターは、宿主細胞を形質転換することができ、かつ、細胞内でヌクレオチドの複製を行う能力を有してしているレプリコン(例えば、プラスミド、クロモソーム、ウイルス、コスミドなど)である。

他方、組み込み用ベクターは、宿主細胞中ではレプリコンとしては働かないが、宿主を安定に形質転換するために、宿主中のレプリコン(典型的には、クロモソーム)に駐留物を組み込む能力を有するベクターである。

**【0033】**

この発明の別の形態の1つとして、該ペプチドを用いることによってHCV細胞を標的にする細胞傷害性T細胞を誘導する誘導方法が含まれる。この発明の誘導方法は、例えば、HLA-A2を発現している細胞に該ペプチドを添加してHLA-A2上に提示させ、このペプチドをHLA-A2により提示した細胞でT細胞を刺激し、このT細胞をCTLに誘導することからなっているのがよい。この方法において使用するHLA-A2発現細胞は、HCV患者の血液から採取したものでよいが、非HLA-A2発現細胞にHLA-A2をコードする遺伝子を導入して作成することもできる。したがって、この発明に係る該ペプチドは、HCVの検出ならびに診断のために使用することができるばかりではなく、C型肝炎ウイルス関連疾患のワクチンなどの医薬組成物として有用である。

また、このようにして誘導されたCTLは、HCV感染細胞を標的にして該HCV感染細胞を攻撃するので、該ペプチドと同様に、細胞療法などの医薬組成物としても使用することができる。

**【0034】**

さらに、この発明の別の形態である該C型肝炎ウイルス由来ペプチド、ポリペプチド、

ヌクレオチドおよび/または抗体・抗体類似活性物質は、HCV感染を検出・診断するのに有用である。

HCVの検出ならびにHCV関連疾患の診断は、例えば、該ペプチドをコードする核酸配列との相互作用および/または反応性を利用して、該ペプチドの存在の検出、相応する核酸配列存在量の検出、該ペプチドの個体中での生体分布の決定および/または個体由来の検体中の存在量の決定などによって行うことができる。つまり、HCVの検出ならびにHCV関連疾患の診断は、該ペプチドをマーカーとして検定することによって行なうことができる。また、その測定は、それ自体公知の測定手法で行なうことができ、かかる測定方法としては、例えば、抗原抗体反応系、酵素反応系、PCR反応系などを利用した方法が挙げられる。

#### 【0035】

この発明のさらに別の形態である医薬組成物としては、例えば、ワクチンが挙げられる。ワクチンは、C型肝炎ウイルス由来ペプチド、ポリペプチドおよび/またはヌクレオチドからなっていて、医薬的に許容される補助剤および/または担体を適宜含有していてもよい。補助剤としては、免疫応答を強化し得るアジュバント、例えばフロイドの不完全アジュバント、酸化アルミニウム、ゲルなどを使用することができる。また、担体としては、例えば、PBS、蒸留水などの希釈剤、生理食塩水などを使用することができる。

この発明の医薬組成物は、その使用形態に応じて、例えば、経口、静脈投与や皮下投与などの非経口または経皮経路で投与することができる。その剤形としては、例えば、錠剤、顆粒剤、ソフトカプセル剤、ハードカプセル剤、液剤、油剤、乳化剤などが挙げられる。かかる医薬組成物の投与量は、投与する患者の症状などにより、適宜変動し得るが、一般的には、成人に対して1日当たり、該ペプチド量として0.1~10mgであるのがよく、投与間隔としては数日もしくは数ヶ月に1回投与するのがよい。

#### 【実施例1】

##### 【0036】

この発明を実施例によりさらに詳細に説明する。ただし、これらの実施例はこの発明をより具体的に説明するために例示的に示したものであり、この発明は以下の実施例により限定されるものではない。

なお、以下の実施例において使用したアミノ酸の略語は次の通りである。

Aはアラニン、Cはシステイン、Dはアスパラギン酸、Eはグルタミン酸、Fはフェニルアラニン、Gはグリシン、Hはヒスチジン、Iはイソロイシン、Kはリジン、Lはロイシン、Mはメチオニン、Pはプロリン、Rはアルギニン、Sはセリン、Tはトレオニン、Vはバリン、Yはチロシンをそれぞれ意味する。

(ペプチド)

HCVゲノタイプ1bタンパク質の良好保存領域からのHLA-A2結合性モチーフまたはHLA-A24結合性モチーフを有する合成ペプチドを使用した(表1)。ネガティブコントロールとして、HLA-A2結合性モチーフを有するHIV由来ペプチドを使用した。これらのペプチドはいずれも市販品を使用し、その純度は逆相高圧液体クロマトグラフィーで分析したところ90%以上であった。

##### 【0037】

【表 1】

表 1

No	ペプチド名	改変名	領域	配列	HCV 患者 (n=12)		健常人 (n=10)	
					陽性		陽性	
					人数	%	人数	%
3	2132	NS5A-2132	NS5A	RYAPACKPL	12	100	1	10
4	717 1bA24-	E2-717	E2	EYVLLLFL	2	17	0	0
5	1100 1bA24-	NS3-1100	NS3	MYTNVDQDL	0	0	0	0
6	1773	NS4A-1773	NS4A	QYLAGLSTL	0	0	0	0
7	790 1bA24-	E2-790	E2	LYGVWPLLL	0	0	0	0
8	1031	NS3-1031	NS3	AYSQQTRGL	0	0	0	0
9	834 1bA24-	NS2-834	NS2	HYKLFLARL	0	0	0	0
10	1292 1bA24-	NS3-1292	NS3	TYATYGKFL	1	8	0	0
11	1266	NS3-1266	NS3	AYMSKAHGI	6	50	0	0
12	488	E2-488	E2	HYAPRPCGI	9	75	0	0
13	213 1bA24-	E1-213	E1	VYEAADMIM	6	50	0	0
14	1716 1bA24-	NS4B-1716	NS4B	PYIEQGMQL	1	8	0	0
15	1767	NS4B-1767	NS4B	NFISGIQYL	0	0	0	0
16	910 1bA24-	NS2-910	NS2	PYFVRAHGL	0	0	0	0
17	1727	NS4A-1727	NS4A	QFKQKAIGL	3	25	0	0
18	885	NS2-885	NS2	IFTITKILL	5	42	0	0
19	135	C-135	C	GYPIVGAPL	1	8	0	0
20	631	E2-631	E2	MYVGGVEHF	0	0	0	0
21	932	NS2-932	NS2	HYVQMALMK	5	42	0	0
22	947 1bA24-	NS2-947	NS2	TVVYDHLTPL	7	58	0	0
23	1854 1bA24-	NS4B-1854	NS4B	GYGAGVAGA	2	17	0	0
24	1243 1bA24-	NS3-1243	NS3	AYAAQGYKV	2	17	0	0
25	1081	NS3-1081	NS3	VYHGAGSKT	6	50	0	0

【0038】

【表 1-1】

表 1 続き 1

26	787	E2-787	E2	AYALYGVWP	2	17	0	0
27	617	E2-617	E2	HYPCTVNFTI	4	33	0	0
	1bA24-							
28	1417	NS3-1417	NS3	VFVGLILLTL	2	17	0	0
	1bA24-							
29	2146	NS5A-2146	NS5A	TFLVGLILLTL	2	17	0	0
30	822	NS2-822	NS2	VFVGLNQYL	4	33	0	0
	1bA24-							
31	1556	NS3-1556	NS3	EFWESVFTG	0	0	0	0
32	176	C-176	C	IFLLALLSCL	7	58	0	0
33	837	NS2-837	NS2	LFLARLIWWI	0	0	0	0
34	848	NS2-848	NS2	YFITREAH	1	8	1	10
	1bA24-							
35	1792	NS4B-1792	NS4B	AFTASITSPL	0	0	0	0
	1bA24-							
36	1990	NS5A-1990	NS5A	DFKTWLQSK	1	8	0	0
	1bA24-							
37	2121	NS5A-2121	NS5A	FFTEVDGVR	1	8	0	0
38	173	C-173	C	SFSIFLLALL	7	58	0	0
39	711	E2-711	E2	SFAIKWEYVL	1	8	0	0
40	1bA2-35	C-35	C	YLLPRRGPRI	12	100	0	0
41	1bA2-132	C-132	C	DLMGYPLV	0	0	0	0
42	1bA2-178	C-178	C	LLALLSCLTV	1	8	0	0
43	1bA2-220	E1-220	E1	ILHTPGCV	3	25	0	0
44	1bA2-363	E2-363	E2	SMVGNWAK	0	0	0	0
45	1bA2-401	E2-401	(HVR)	SLLAPGAKQI	0	0	3	30
46	1073	NS3-1073	NS3	CINGVCWTV	0	0	0	0
47	1169	NS3-1169	NS3	LLCPAGINAV	1	8	2	20
48	1287	NS3-1287	NS3	KLVALGINAV	1	8	0	0
49	1406	NS3-1406	NS3	TGAPVYST	1	8	0	0
50	1789	NS4B-1789	NS4B	SLMAFTAAV	0	0	0	0
51	1807	NS4B-1807	NS4B	LLFNILGGWV	0	0	0	0
52	1851	NS4B-1851	NS4B	ILAGYGAGV	0	0	1	10
53	2252	NS5A-2252	NS5A	ILDSFDPLV		0	0	0
54	2692	NS5B-2692	NS5B	RLIVFPDLGV	1	8	0	0
55	2727	NS5B-2727	NS5B	GLQDCTMLV	2	17	1	10
56	1bA2-150	C-150	C	ALAHGVRAL	0	0	1	10
57	1bA2-168	C-168	C	NLPGCSFSI	0	0	1	10
	1bA24-							
60	2422	NS5B-2422	NS5B	SYTWTGALI		0	0	0
	1bA24-							
61	2482	NS5B-2482	NS5B	HYRDVLKEM	3	25	1	10
	1bA24-							
62	2990	NS5B-2990	NS5B	WFMWCLLLI	7	58	0	0
63	789	E2-789	E2	AFYGVWPLL	0	0	0	0
	1bA24-							
64	1727	NS4B-1727	NS4B	QFKQKALGL	1	8	0	0
	1bA24-							
65	2613	NS5B-2613	NS5B	QYSPGQERVE	0	0	0	0
	1bA24-							
66	1727	NS4B-1727	NS4B	QFKQKALGLI	3	25	0	0

カットオフ値は 1.83である。

【0039】

【表 2】

	No.	40 陽性率
HCV感染症関連疾患	60	56 (93.3%)
B型肝炎ウイルス感染者	24	0 (0%)
B型肝炎ウイルスワクチン接種者	10	0 (0%)
健常人	27	0 (0%)
自己免疫疾患患者	22	0 (0%)
HTLV-1感染者	10	8 (80%)
HIV感染者	3	3 (100%)
総数	156	67
		C 35
感受性		93.3%
感受性		88.5%
OD 率		

P&lt;0.001

検出率を、カットオフ値で陽性な患者の数で算出した (平均±3SD)。

NS5A2132 は、0.202であり、C35 は、0.13である。

統計解析を、 $\chi^2$ 試験で行った。

## 【0040】

## (ELISA)

血清中のペプチド特異的 IgG は ELISA によって測定した。まず、各ペプチドをジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。ペプチドを、クロスリッシャーとしてのジサクシンイミジルスベレート (DSS) を含む 0.1M 炭酸ナトリウム/炭酸水素ナトリウム溶液で希釈した。ELISA プレートにペプチド  $20\mu\text{g}/\text{ウェル}$  で  $4^{\circ}\text{C}$  で一夜反応させて結合させた。ウェルを 0.05% ツイーン・PBS (PBST) で 3 回洗浄し、プレートをブロックエース (登録商標) でブロックして  $4^{\circ}\text{C}$  で一夜放置した。血漿または血清サンプルを 0.05% ツイーン・ブロックエースで 100 倍、200 倍および 400 倍にそれぞれ希釈し、得られたサンプルを各ウェル当り  $100\mu\text{g}$  ずつ添加した。サンプルを  $37^{\circ}\text{C}$  で 2 時間培養した後、プレートを PBST で 3 回洗浄し、1000 倍希釈ウサギ抗ヒト IgG ( $\gamma$  鎖特異的) を各ウェル当り  $100\mu\text{g}$  添加して  $37^{\circ}\text{C}$  で 2 時間培養した。さらに、PBST で 3 回洗浄した後、1000 倍希釈ウサギ抗ヒト IgG と共有結合させた西洋ワサビパーオキシダーゼ-デキストランポリマーを各ウェル当り  $100\mu\text{g}$  添加し、プレートを室温で 40 分間培養した。プレートを洗浄した後、テトラメチルベンジジン基質溶液を各ウェル当り  $100\mu\text{g}$  添加し、2.0M リン酸を添加して反応を停止させた。カットオフ値を、健常者の光密度コントロールの平均±3SD として算出した。

## 【0041】

(ペプチド特異的 IgG の吸収ならびに溶出)

各ウェル当り  $100\mu\text{l}$  の血漿または血清サンプルを 0.05% ツイーン・ブロックエース (登録商標) で希釈し、プレートのウェル中に固定したペプチド (各ウェル当り  $20\mu\text{g}$ ) に  $37^{\circ}\text{C}$  で 2 時間吸収させた。この操作を 3 回繰り返した後、上清中のペプチド特異的 IgG レベルを ELISA で測定した。初回の吸着でペプチド固定プレートに結合させた抗体を、各ウェル当り  $30\mu\text{l}$  の 5M NaCl/50 mM クエン酸バッファ (pH 3.0) (1.0M Tris-HCl の 0.05% ツイーン・ブロックエース (pH 7.5) で中和した) によって溶出し、溶出した分画中のペプチド特異的 IgG レベルを ELISA で測定した。

## 【0042】

(ペプチド特異的 CTL アッセイ)

ペプチド特異的 CTL の検出に使用する方法は当該技術分野において慣用されている方法である。PBMC をウェル当り  $1 \times 10^5$  個の細胞になるように U 底型 96 ウェルマイ

クロカルチャープレート各ウェルに入れ、 $10\mu\text{M}$  のペプチドとともに  $200\mu\text{l}$  の培地中で培養した。この培地の組成は、45% RPMI-1640 と、45% AIM-V (登録商標) と、10% ウシ胎児血清 (FCS) と、 $100\text{ U/ml}$  のインターロイキン 2 (IL-2) と、 $1\text{ mM}$  MEM 非必須アミノ酸溶液と、からなっている。培養 3 日目、6 日目、そして 9 日目にそれぞれ培地半分を除いて、対応するペプチド ( $20\mu\text{g/ml}$ ) を含んだ新しい培地と入れ替えた。培養 12 日目に、培養した細胞を採取し、対応するペプチドまたはネガティブコントロールとしての HIV ペプチドのいずれかを予め付着させた CIR-2402 細胞に応答するインターフェロンガンマ (IFN- $\gamma$ ) の産生能を試験した。各ペプチドに対して 4 個のウェルを使用し、アッセイは 2 回行なった。HIV ペプチドに反応するバックグラウンド IFN- $\gamma$  産生は得られたデータ値から控除した。抑制アッセイには、ペプチド反応性 CTL は、CD8 単離キットを用いて精製し、そのペプチド特異的 IFN- $\gamma$  産生を、 $20\mu\text{g/ml}$  の抗 HLA クラス I (W6/32, IgG2a) モノクローナル抗体、抗 CD8 (Nu-Ts/c, IgG2a) モノクローナル抗体または抗 HLA クラス II (H-DR-1, IgG2a) モノクローナル抗体のいずれかの存在下において測定した。バックグラウンド IFN- $\gamma$  産生は得られたデータ値から控除した。

#### 【0043】

(統計)

値は平均  $\pm$  SD として示している。統計的分析は、マン-ウィットニー・ユー (Mann-Whitney U) 試験およびカイ 2 乗試験を用いて行った。P < 0.05 値は統計学的に有意であると考えられる。

#### 【0044】

(HCV ペプチドに対する抗体の検出)

HCV 感染患者 12 名と健常者 (HD) 10 名の血清について 62 種類の各ペプチドに対して反応する IgG レベルを測定した (表 1)。各ペプチドに対する抗体の陽性率を表 1 に示した。その結果、HCV 感染患者の血中 IgG と高率に反応し、かつ健常人血清とはほとんど反応しないペプチドが複数見出された。

例えば、No 3 の NS5A-2132 (HCV の NS5A タンパクの 2132 番から 2140 番に相当、以下同様に省略する)、No 11 (NS3-1266)、No 12 (E2-488)、No 13 (E1-213)、No 22 (NS2-947)、No 25 (NS3-1081)、No 32 (C-178)、No 38 (C-173)、No 40 (C-35)、No 62 (NS5B-2990) などが挙げられる。代表的な ELISA 法による HCV 感染患者の血中 IgG 測定結果を図 1 および図 2 に示す。

図 1 に示した患者血清では C-35 に対する IgG 抗体が検出された。

図 2 の (A)-(D) に示した 4 名の患者血清中にはそれぞれ NS5A-2132 (A)、NS3-1081 (B)、E2-488 および E-213 (C)、C-176 および C-173 (D) 反応性 IgG 抗体が検出された。これらのペプチド反応性抗体のペプチド特異性は、吸収ならびに溶出試験によって確認した。

図 1 に示した患者血清中の C-35 ペプチド反応性抗体の吸収・溶出実験結果を代表例として図 3 に示す。この抗体は C-35 により吸収されたが、無関係なペプチドである NS5A-2252 によっては吸収されなかった (図 3 上段)。さらにこの抗体は C-35 吸着画分より溶出された (図 3 下段)。

#### 【0045】

表 1 の中でも C-35 ペプチド反応性抗体は HCV 感染者では 100%、一方、健常人では 0% と、HCV 特異性が高かった。HCV の C-35 ペプチドの配列は種々のウイルス、たとえば HIV-1 の tet タンパク (54-58 番のアミノ酸配列) や env タンパク (59, 158-162, 717-727 のアミノ酸配列) と部分的に相同性を示した。また、HTLV-I の種々のタンパク (pol 724-755, rex 5-9, rex 310-313, tax 70-74 など) ととも相同性を示した。そこで、C-35 ペプチド反応性抗体を HCV 感染症関連疾患 60 例 (慢性 C 型肝炎 22 例、肝硬変 20 例、肝癌 18 例)、B 型肝炎ウイルス感染者 24 例、B 型肝炎ウイルスワクチン接種者 10 例、健常人 27 例、自己免疫疾患患者 22 例、HTLV-I 感染者 10 例、および HIV 感染者 3 例、計 156 例について 2 重盲検法で調べた。その結果を表 2 に示す。この結果より、C-35 ペプチド反応性抗体の HCV 特異性および検出率

はそれぞれ88.5%および93.5%であった。

#### 【0046】

(ペプチド特異的CTL活性の誘発)

HLA-A24結合ペプチド6種(No3、12、13、25、32、33)およびHLA-A2結合ペプチド18種(No40からNo57まで)をHLA-A24もしくはHLA-A2陽性のHCV感染患者各5名の末梢血単核球(PBMC)と培養した。コントロールとして該PBMCをHIVペプチドと培養した。そして、それらの培養PBMCについて、対応するペプチドをパルスしたC1RA2402細胞またはT2細胞に应答するIFN- $\gamma$ 産生能を調べた。その結果、HLA-A24結合ペプチド6種(No3、12、13、25、32、38)は、HLA-A24陽性HCV患者10名からの末梢血PBMCからCTLを誘導することができた(図4A)。また、HLA-A24結合性ペプチドによる(B)HCV由来のHLA-A2結合性ペプチド(No40からNo57)によるHLA-A2陽性HCV患者5名からの末梢血PBMCからCTLを誘導することができた(図4B)。

#### 【0047】

さらに、ペプチド刺激PBMCの細胞傷害活性は<sup>51</sup>Cr遊離試験によって確認した。その代表的結果を図5に示す。

図5Aは、HCV由来のHLA-A24結合性ペプチド(No3、12、13、25、32、38)によりHLA-A24陽性HCV患者末梢血PBMCから誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。誘導ペプチドを付着させたC1R-A2402細胞(図中ではC1R-A2402と表示)に対する細胞傷害作用はコントロールのHIVペプチドを付着させたC1R-A2402細胞(図中ではC1R-A2402 HIVと表示)に比べ有意に高かった。

図5Bは、HCV由来のHLA-A2結合性ペプチド(No40、41)によりHLA-A2陽性HCV患者末梢血PBMCから誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。誘導ペプチドを付着させたT2細胞(図中ではT2と表示)に対する細胞傷害作用はコントロールのHIVペプチドを付着させたT2細胞(図中ではT2 HIVと表示)に比べ有意に高かった。

その結果、これらのPBMCは、対応するペプチド(ネガティブコントロールとしてのHIVペプチド以外)を予め装填したT2細胞に対して有意差レベルの細胞傷害性を示した。

#### 【0048】

この細胞毒性のHLAクラスI拘束性は抗CD8モノクローナル抗体を用いた抑制試験によって確認した(図6)。図6は、CTL活性の抗CD8抗体による抑制の代表例を示す。HCV由来のHLA-A2結合性ペプチド(No40)によりHLA-A2陽性HCV患者末梢血PBMCから誘導されたCTLの細胞傷害活性は抗CD8抗体により抑制されたが、抗CD4やコントロールの抗CD14抗体では抑制されなかった。

【産業上の利用可能性】

#### 【0049】

この発明に係るC型肝炎ウイルス由来ペプチドは、HLA結合モチーフをその配列中に含んでいて、C型肝炎ウイルスに反応する抗体により認識されるとともに、さらにHLA-A2またはHLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有している。

したがって、この発明のC型肝炎ウイルス由来ペプチドは、HCV感染に起因する疾患に対して有効なワクチンとなり得る。

【図面の簡単な説明】

#### 【0050】

【図1】本発明において、ELISA法によるHCV感染患者の血中IgG測定結果を示すグラフ。

【図2】本発明において、ELISA法によるHCV感染患者の血中IgG測定結果を示すグラフ。

【図 3】本発明において、図 1 に示した患者血清中の C-35 ペプチド反応性抗体の代表例の吸収・溶出実験結果を示すグラフ。

【図 4 A】本発明における HCV 由来の HLA-A24 結合ペプチド 6 種 (No 3, 12, 13, 25, 32, 38) の CTL 誘導結果を示すグラフ。

【図 4 B】本発明における HCV 由来の HLA-A2 結合性ペプチド (No 40 から No 57) の CTL 誘導結果を示すグラフ。

【図 5】本発明において、 $^{51}\text{Cr}$  遊離試験によるペプチド刺激 PBMC の細胞傷害活性の代表的結果を示すグラフ。

【図 6】本発明において、抗 CD8 モノクローナル抗体を用いた抑制試験によるペプチド刺激 PBMC の細胞毒性の HLA クラス I 拘束性を確認したグラフ。



## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KURUME UNIVERSITY

&lt;120&gt; HCV-derived peptides

&lt;130&gt;PQU11363

&lt;160&gt; 7

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Tyr	Leu	Leu	Pro	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Leu
1				5					10

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Arg	Tyr	Ala	Pro	Ala	Cys	Lys	Pro	Leu
1				5				9

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

His	Tyr	Arg	Pro	Arg	Pro	Cys	Gly	Ile
1				5				9

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Val	Tyr	Glu	Ala	Ala	Asp	Met	Ile	Met
1				5				9

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 10

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu  
1 5 10

<210> 6  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

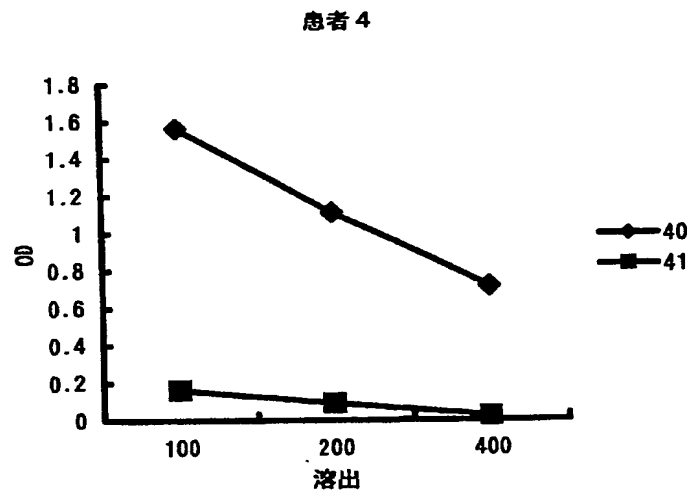
<400> 6  
Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu  
1 5 10

<210> 7  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu  
1 5 10

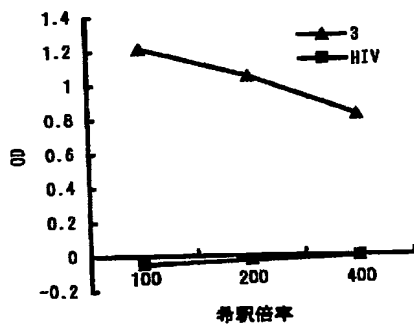
【書類名】図面

【図1】

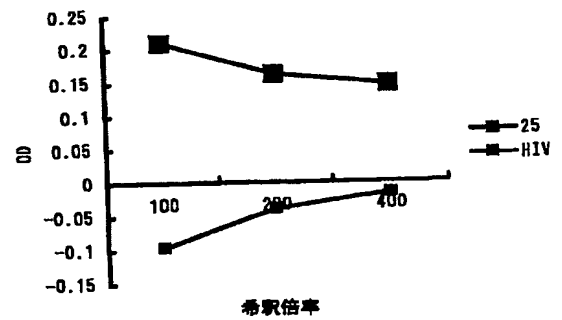


【図2】

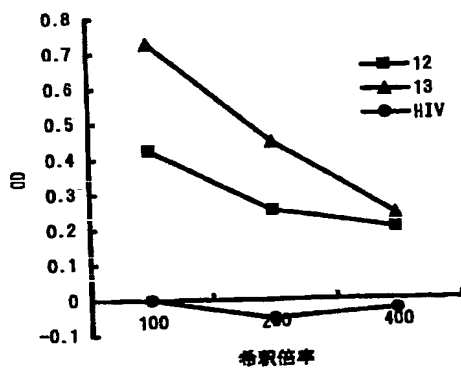
(A)



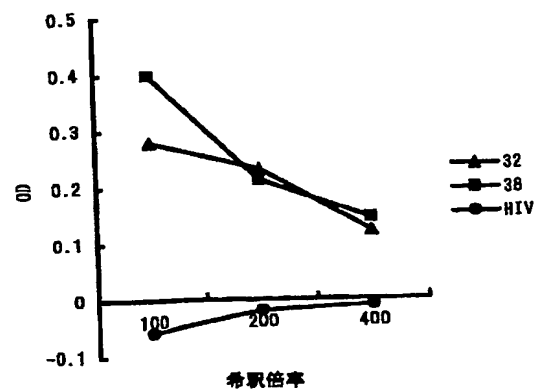
(B)



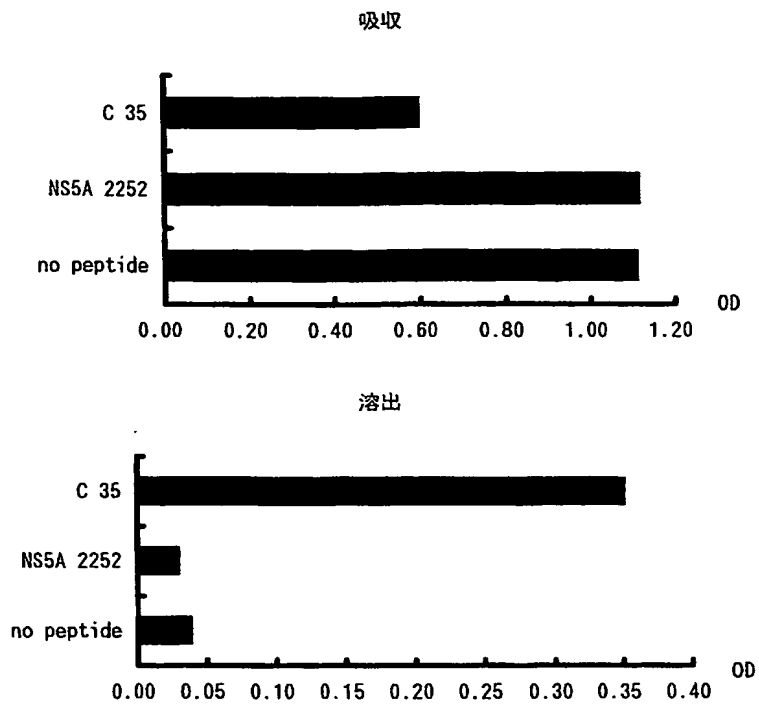
(C)



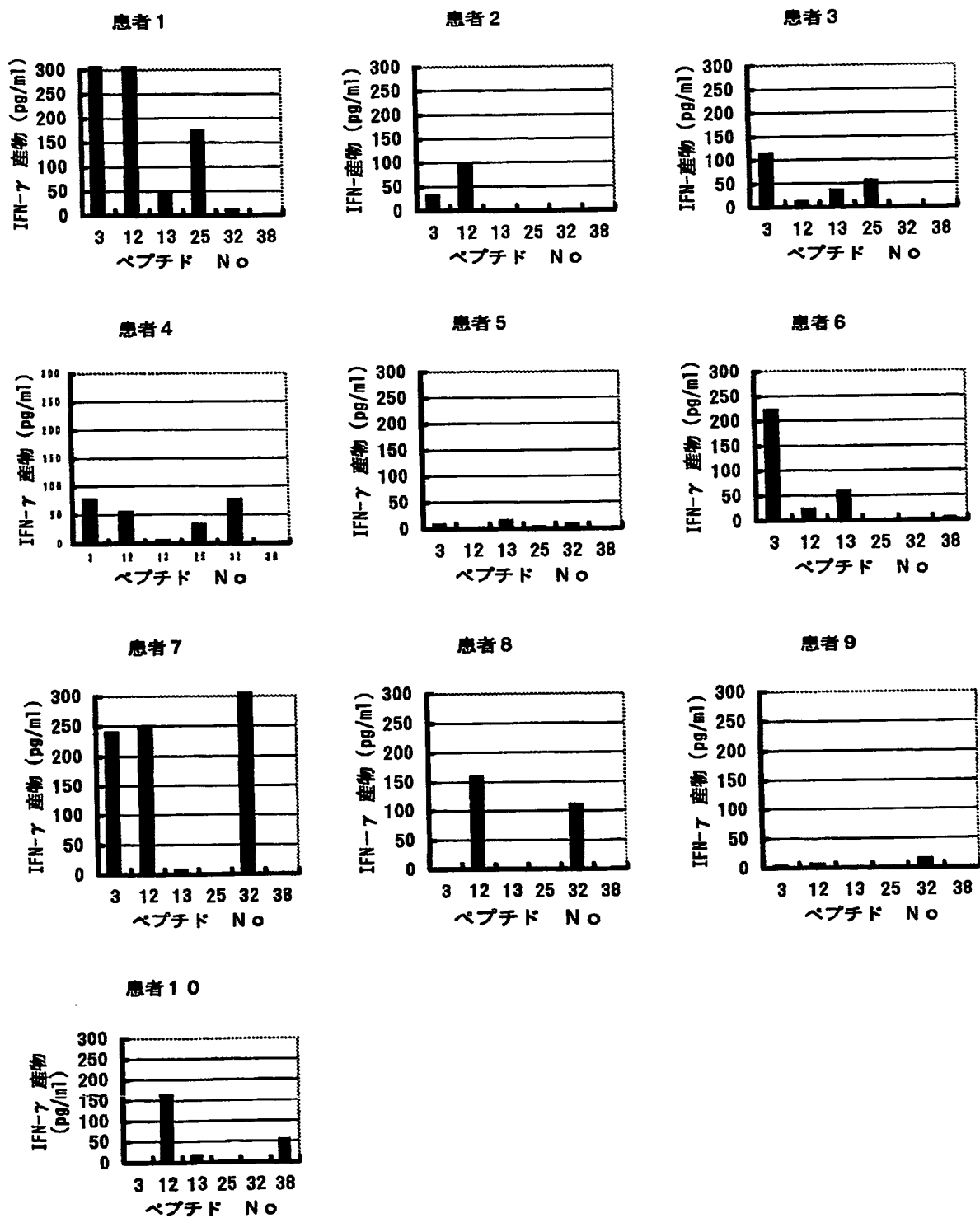
(D)



【図 3】



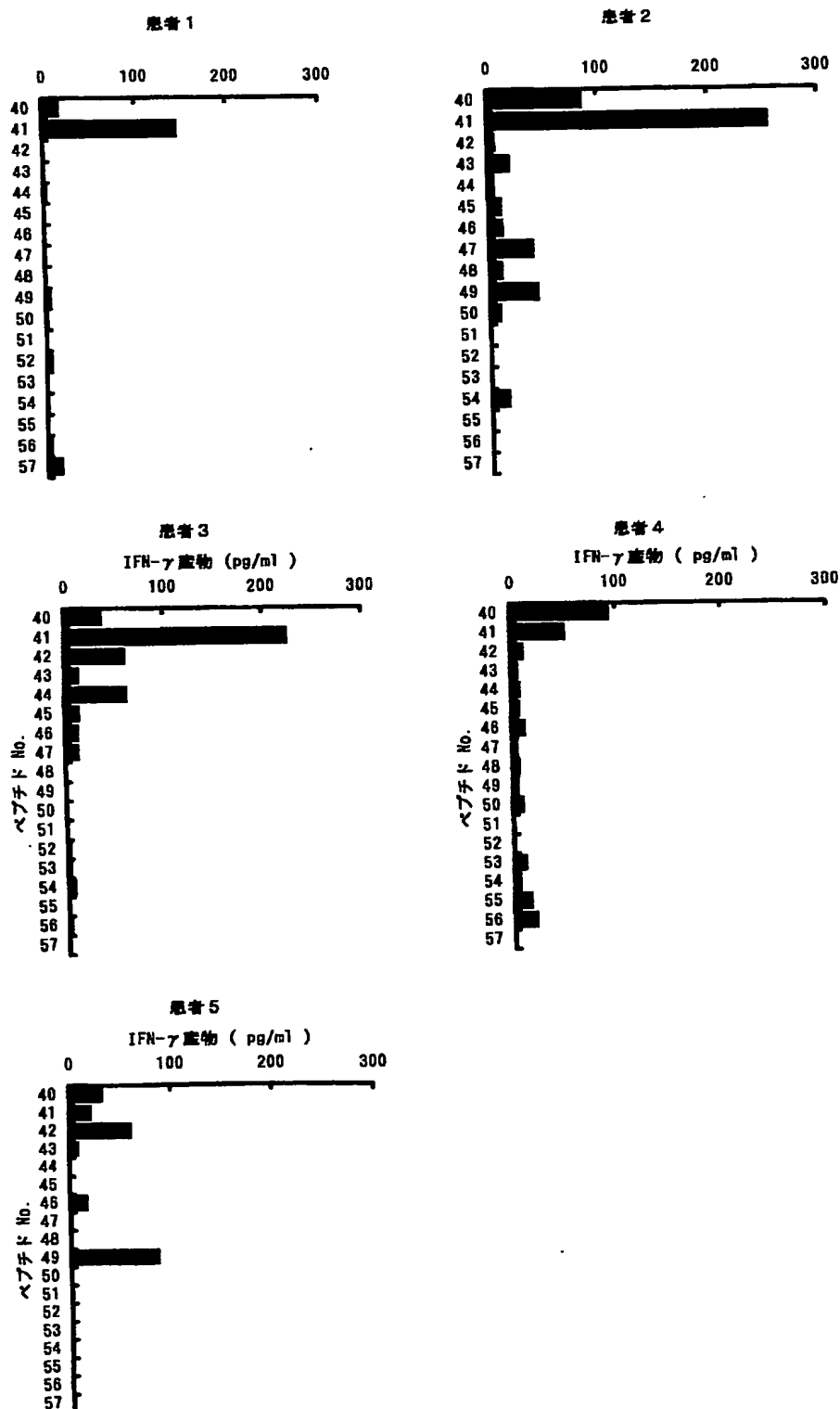
【図4A】

A. HLA-A24 IFN- $\gamma$  アッセイ

【図 4 B】

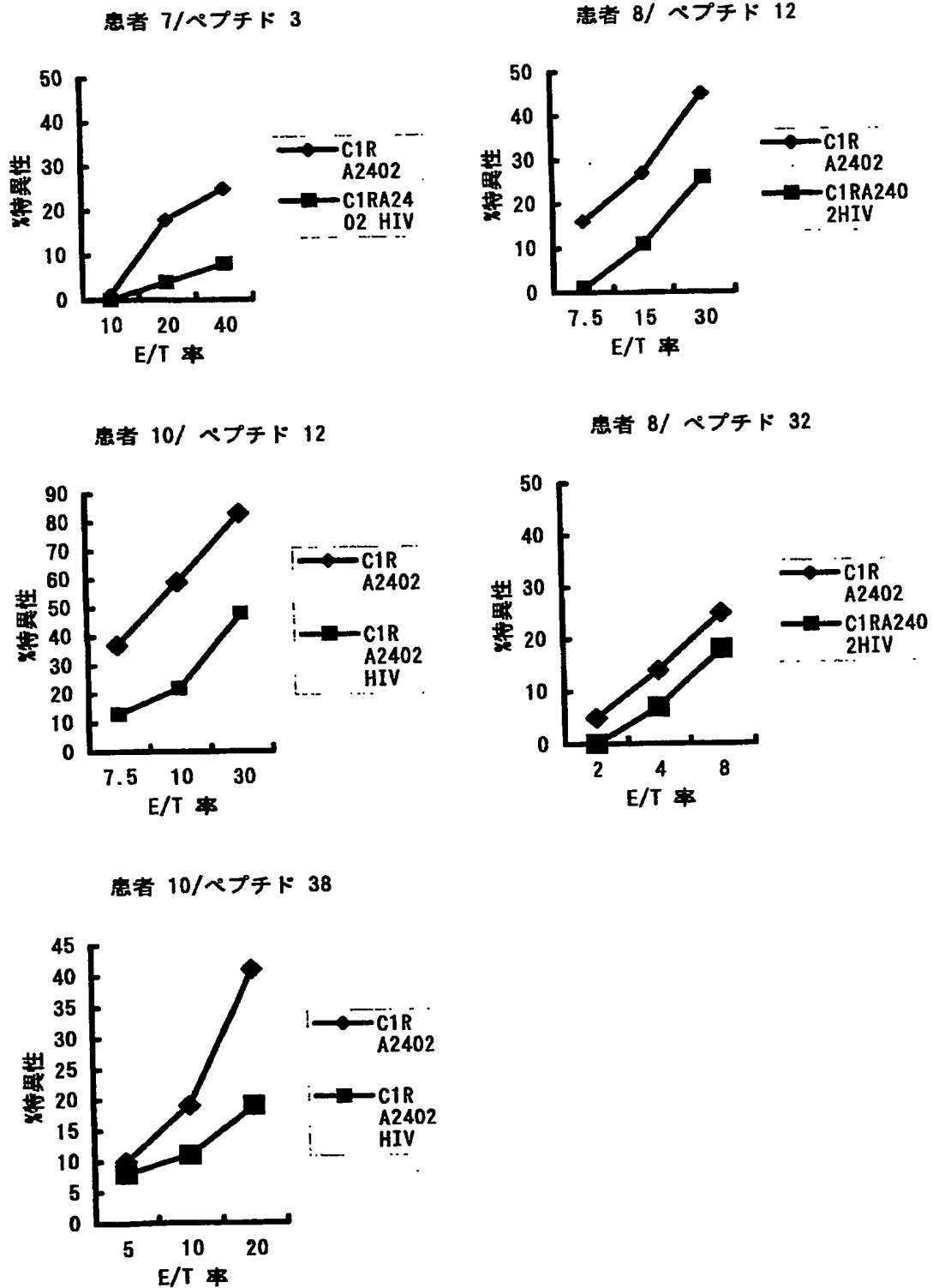
PBMCを誘導するペプチドのCTL活性: 各々のペプチドで刺激されたPBMCを、  
IFN- $\gamma$  アッセイ (A) および<sup>51</sup>Cr 遊離アッセイ (C) によって、認識する能力を試験する。

A



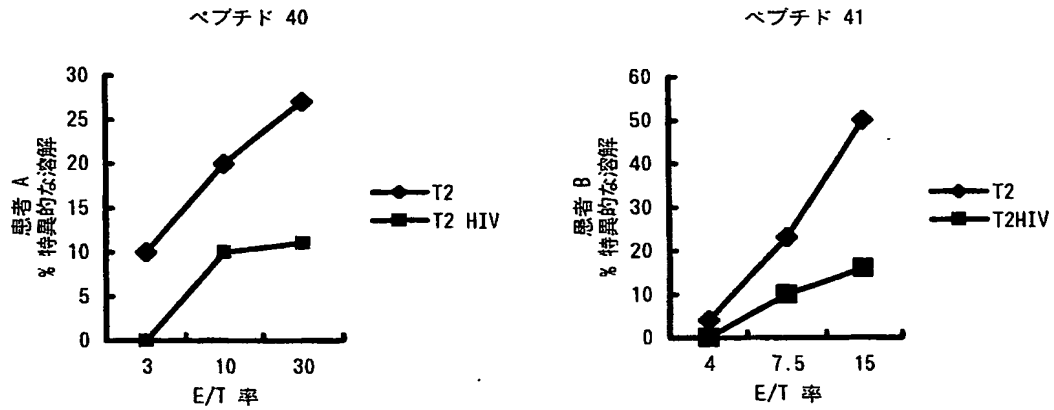
【図 5 A】

HLA-A24 51Cr 遊離アッセイ



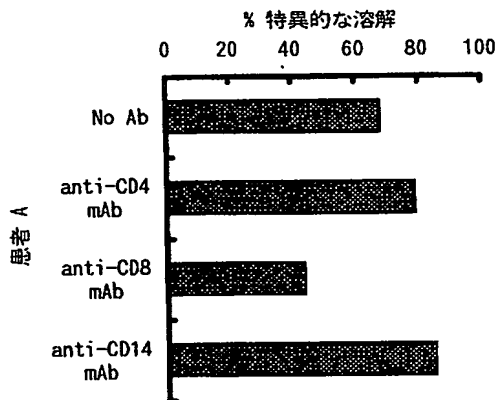
【図 5 B】

<sup>51</sup>Cr 遊離アッセイ



【図 6】

<sup>51</sup>Cr 遊離抑制アッセイ



BEST AVAILABLE COPY



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 C型肝炎ウイルスの診断およびC型肝炎の治療に有用な、C型肝炎ウイルス（HCV）ペプチドを提供することを課題とする。

【解決手段】 HLA結合モチーフを配列中に含み、かつ、C型肝炎ウイルスに反応する抗体により認識されることを特徴とするC型肝炎ウイルス由来ペプチドを提供することで課題を解決した。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 3 - 3 3 0 2 5 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 9 0 4 5 9 0 3 ]

1. 変更年月日

1 9 9 9 年 3 月 2 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

福岡県久留米市旭町 6 7 番地

氏 名

学校法人 久留米大学